镰刀菌毒素对断奶小母猪阴户、生殖器官指数、子宫雌激素受体分布和表达的影响

牛群升　杨维仁*　黄丽波　张崇玉　张桂国　梁才芝　姜淑贞*

（山东农业大学动物科技学院，泰安　271018）

摘　要：本试验旨在研究自然霉变饲粮中镰刀菌毒素对断奶小母猪阴户、生殖器官指数、雌激素受体（ERs）分布和表达影响。选用 35 日龄平均体重（8.45±0.94） kg 的健康三元杂交（杜×长×大）断奶雌性仔猪 40 头，随机分为 2 个处理，每个处理 20 头。对照组饲喂基础饲粮，试验组饲喂含镰刀菌毒素的饲粮[玉米赤霉烯酮（ZEN）0.90 mg/kg；呕吐毒素（DON）1.43 mg/kg；烟曲霉毒素（FUM）5.85 mg/kg）]。预试期 7 d，正试期 35 d。结果表明：试验组 35 d 仔猪的阴户长、宽和面积及断奶母猪生殖器官指数均显著高于对照组（P<0.05）。雌激素受体 α (ERα)免疫阳性物质主要见于子宫内膜的腺上皮细胞和子宫肌层细胞的细胞质；雌激素受体 β(ERβ)免疫阳性物质主要见于内膜的动脉管壁平滑肌和肌层平滑肌细胞的胞质内。与对照组相比，试验组仔猪子宫内膜腺上皮细胞 ERα 免疫阳性反应明显增强，且腺泡数量明显增多；而 ERβ 在试验组仔猪子宫肌层平滑肌和动脉管壁平滑肌细胞的阳性细胞数量明显多于对照组。试验组断奶母猪子宫中 *ERα* 和 *ERβ* 的 mRNA 相对表达量显著高于对照组（P<0.05）。由此可见，镰刀菌毒素能够对断奶小母猪生殖系统造成不良影响，这种影响是通过 *ERs* 基因的转录来调控 *ERs* 在子宫中的相对表达量，进而改变生殖器官的发育实现的。

关键词：镰刀菌毒素；断奶小母猪；阴户；子宫；雌激素受体

中图分类号：S828　　　　文献标识码：　　　　　　　　文章编号：

收稿日期：2015-12-04
基金项目：山东省现代农业产业技术体系生猪创新团队建设项目(SDAIT-06-022-05)
作者简介：牛群升(1988 –)，男，山东临沂人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: qunshengniu@163.com
*通信作者：杨维仁，教授，博士生导师，E-mail: wryang@sdau.edu.cn；姜淑贞，副教授，硕士生导师，E-mail: shuzhen305@163.com

镰刀菌毒素是产毒霉菌在基质（粮食、作物及饲料）上生长繁殖过程中产生的次级代谢产物，是造成全球谷物经济损失最大的一类污染性霉菌毒素[1-2]。对动物健康及生产危害最大的镰刀菌毒素包括玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEN）、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（deoxynivalenol，DON）和烟曲霉毒素（fumonisin，FUM）等。镰刀菌毒素中 ZEN 对动物繁殖危害最大，诱发母猪雌激素过多症，如外阴红肿、直肠脱落、子宫和乳腺增生等[3]。报道证实 ZEN 能够改变雌激素受体（estrogen receptors，*ERs*）mRNA 在子宫中的表达量[4-5]。国内外研究镰刀菌毒素对动物生殖系统的影响多以纯毒素形式进行，但实际生产中，镰刀菌产生的毒素往往具有多样性[6]。且镰刀菌毒素对断奶母猪子宫角内 ERs 分布的影响尚未见报道。因此，本试验旨在研究自然霉变玉米和霉变玉米蛋白粉中镰刀菌毒素对断奶母猪生殖器官发育、ERs 的分布及表达的影响，为生猪健康生产提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验动物和饲养管理

选择 35 d 的三元杂交（杜×长×大）断奶雌性仔猪 40 头，平均体重（8.45±0.94） kg，随机分为 2 个处理，每个处理 20 头，各处理间初始体重差异不显著（P>0.05）。

试验在山东农业大学畜牧科技园进行。仔猪采用单体笼（0.48 m^2）饲养。单体笼使用塑料漏缝地板，安装有乳头饮水器和料槽，仔猪自由采食和饮水。试验开始前对猪舍进行全面清扫、消毒，试验期间每周进行 1 次猪舍消毒。舍内安装红外保温灯，第 1 周猪舍内环境温度维持在 30 ℃左右，之后将猪舍内环境温度调整在 26～28 ℃，猪舍相对湿度为 65%左右。

1.2　试验设计及试验饲粮

断奶母猪基础饲粮参考 NRC（2012）[7]营养需要配制，饲粮组成及营养水平见表 1。试验采用单因子试验设计，对照组饲喂基础饲粮，试验组用 50%自然霉变玉米和 50%霉变玉米蛋白粉代替基础饲粮中的玉米和玉米蛋白粉，预试期 7 d，正试验 35 d。

表 1　饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis)　　%

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Experimental group
原料 Ingredients		
玉米 Corn	61.70	30.85
发霉玉米 Contaminated-corn		30.85
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	5.00	2.50
发霉玉米蛋白粉 Contaminated corn gluten meal		2.50
豆粕 Soybean meal	24.00	24.00
乳清粉 Whey powder	3.00	3.00
豆油 Soybean oil	2.50	2.50
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.30	1.30
石粉 Limestone	1.10	1.10
食盐 NaCl	0.40	0.40
预混料 Premix[1)]	1.00	1.00
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]		
消化能 DE/(MJ/kg)	14.25	14.25
粗蛋白质 CP	19.26	19.11
钙 Ca	0.80	0.82
有效磷 P	0.33	0.33

食盐 NaCl	0.42	0.42
赖氨酸 Lys	1.11	1.11
蛋氨酸 Met	0.41	0.41
苏氨酸 Thr	0.78	0.78
毒素含量 Toxins content/(μg/kg)[3)]		
玉米赤霉烯酮 ZEN		899.40
呕吐毒素 DON	170.20	1 429.40
烟曲霉毒素 FUM	340.00	5 846.50

[1)]预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of diets：VA 3 300 IU；VD_3 330 IU，VE 24 IU，VK_3 0.75 mg，VB_1 1.50 mg，VB_2 5.25 mg，VB_6 2.25 mg，VB_{12} 0.026 mg，泛酸 pantothenic acid 15.00 mg，尼克酸 niacin 22.5 mg，生物素 biotin 0.075 mg，叶酸 folic acid 0.45 mg，Mn 6.00 mg, Fe 150 mg, Zn 150 mg, Cu 9.00 mg, I 0.21 mg, Se 0.45 mg。

[2)]粗蛋白质和钙为实测值，其他为计算值。CP and Ca were analyzed values, while the others were calculated value.

[3)]实测值。Analyzed value。

1.3　样品采集及指标测定

1.3.1　阴户面积测定

试验期间每隔 3 d 用游标卡尺测量仔猪阴户长、宽，并计算阴户面积。仔猪阴户俯视近似菱形，所以本研究以菱形的面积公式（长×宽）/2 来近似计算仔猪阴户面积（图 1），以便比较各处理仔猪阴户的增大效果。

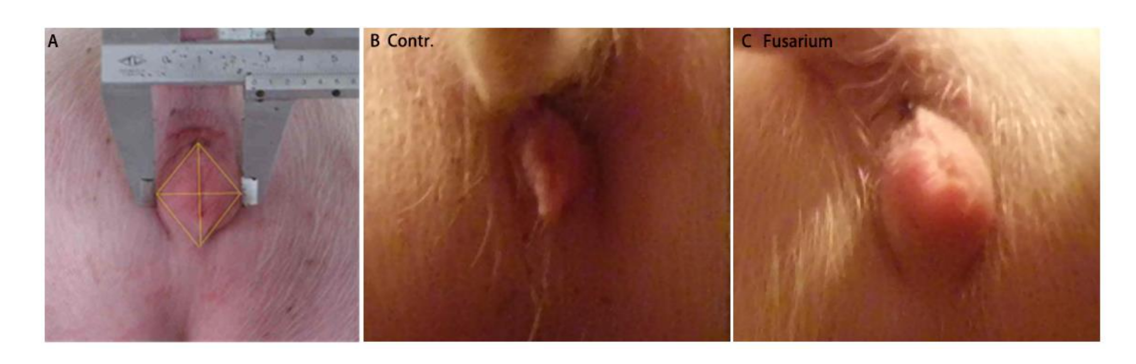


图 1　阴户大小的测量与计算

Fig.1　Measurement and calculation of vulva size

1.3.2　生殖器官指数

试验结束后，每个处理随机选取 10 头仔猪进行屠宰，电击致死后放血，打开胸腔和腹腔，首先对生殖器官（卵巢+子宫角+阴道前庭）进行肉眼观察，记录病变情况并称重，计算生殖器官指数。快速取 2 份子宫角(组织块大小约为 1.5 cm×1.5 cm)样品，一份置于 Bouin's 液中固定，用于检测免疫组化指标；一份置于液氮中，-80 ℃保存，用于测定 *ERs* 的 mRNA 相对表达量。

生殖器官指数（g/kg）=生殖器官重量（g）/猪活体重量（kg）。

1.3.3　免疫组化[链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex,SABC)法]

取 Bouin's 液中固定好的组织块，用乙醇逐级脱水，二甲苯透明，采用 BMJ23 型包埋机包埋。1）切片机（LEICA RM2135，德国）进行切片（5 μm），常规脱蜡至水。2）柠檬酸缓冲液（0.01 mol/L，pH 6.0）进行抗原热修复，磷酸缓冲盐溶液(PBS)（0.01 mol/L，pH 7.2）洗 3 次，5 min/次（下同）。3）3% H_2O_2 室温避光孵育 30 min，用以阻断内源性过氧化物酶，PBS 洗 3 次。4）10%胎牛血清 37 ℃封闭孵育 1 h。5）分别加一抗兔抗雌激素受体 α (Erα)（1:150）多克隆抗体（140113W，北京博奥森生物技术有限公司）和兔抗雌激素受体 β(ERβ)（1:150）多克隆抗体（999882W，北京博奥森生物技术有限公司），4 ℃ 孵育过夜，PBS 洗 3 次。6）加生物素化羊抗兔免疫球蛋白 G（IgG）（1:200）二抗（K132429E，北京中杉

金桥生物技术有限公司），37 ℃恒温箱中孵育 1 h，PBS 洗 3 次。7）加辣根过氧化物酶-链霉素亲和素（1:150），37 ℃孵育 45 min，PBS 洗 3 次。8）二氨基联苯胺(DAB)显色，显微镜下观察显色程度，控制显色时间。9）苏木素复染、脱水、透明、封片，在明视野显微镜下观察免疫阳性细胞分布规律。

1.3.4 *ERs* mRNA 相对表达量的测定

根据 GenBank 已报道的猪的 *Erα*、*ERβ* 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因序列，用 Primer 6.0 设计相应特异性引物，引物由上海生物工程公司合成（表 2）。

取出-80 ℃保存的子宫角样品 50～100 mg，按照 Trizol 试剂盒说明书（Invitrogen 公司，美国）提取总 RNA，利用紫外分光光度计检测 RNA 的质量和浓度，结果显示光密度（OD）值均在 1.8～2.0 之间。检测后的总 RNA 立即进行反转录。反转录按照 PrimeScript$^{@RT}$ Master Mix Perfect Real Time 试剂盒说明书进行操作（TaKaRa Coad：DDR036A，Lot：BK1302，反应体积为 20 μL）。RT-PCR 的反应体系为 20 μL，按照 TaKaRa 公司的荧光定量试剂盒说明书加入相应的反应试剂，其扩增条件均为 95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火延伸 34 s，95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，40 个循环，60 ℃检测荧光信号。目的基因和内参基因分别在不同的 PCR 管中进行反应，每个样品做 3 个重复。

表 2 *ERα*、*ERβ* 和 *GAPDH* 基因的引物序列

Table 2 Primers sequences of *ERα*, *ERβ* and *GAPDH* gene

基因 Gene	登录号 Accession No.	引物序列 Primer sequence (5′—3′)	产物大小 Production length/bp
雌激素受体 α ERα	NM-214220.1	F: GACAGGAACCAGGGCAAGT R: ATGATGGATTTGAGGCACAC	125

雌激素受体 β ERβ	NM-001001533.1	F: ATGCCTTGGTCTGGGTGAT R: GTTCCGTGCCCTTGTTACTG	120
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	NM-001206359.1	F: ATGGTGAAGGTCGGAGTGAA R: CGTGGGTGGAATCATACTGG	154

1.4　数据统计与处理

荧光定量PCR检测结果用$2^{-\Delta\Delta Ct}$进行数据处理，分析基因*ERα*、*ERβ*的mRNA在子宫中的相对表达量。数据采用SAS 9.2统计软件进行均值的双样本成对*t*检验分析（two sample paired *t*-test for the means），$P<0.05$为差异显著。

2　结果与分析

2.1　镰刀菌毒素对断奶母猪阴户和生殖器官指数的影响

自然霉变饲粮中镰刀菌毒素对断奶母猪阴户大小的影响见表 3。试验开始时（0 d）所有处理仔猪的阴户长、宽和面积差异均不显著（$P>0.05$）；试验结束时（35 d）试验组仔猪的阴户长、宽和面积都显著大于对照仔猪（$P<0.05$）。试验组断奶母猪生殖器官指数显著升高（$P<0.05$）。

表 3　镰刀菌毒素对断奶母猪阴户大小和生殖器官指数的影响

Table 3　Effects of *Fusarium* toxins on vulva size and the reproductive organ index of weaning gilts

项目 Items	时间 Day/d	对照组 Control group	试验组 Experimental group	*P* 值 *P*-value
阴户长	0	12.97±0.10	12.17±0.12	0.961

Vulva length/mm （*n*=20）	35	15.72±1.23[a]	29.30±1.03[b]	0.002
阴户宽	0	10.93±0.05	10.11±0.07	0.524
Vulva width/mm （*n*=20）	35	14.33±0.90[a]	22.10±0.40[b]	0.003
阴户面积	0	70.88±0.78	61.52±1.04	0.890
Vulva area/mm^2 （*n*=20）	35	112.63±9.27[a]	323.77±16.86[b]	0.001
生殖器官指数 Reproductive organ index （*n*=10）	35	0.81±0.02[a]	1.82±0.03[b]	<0.001

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05).

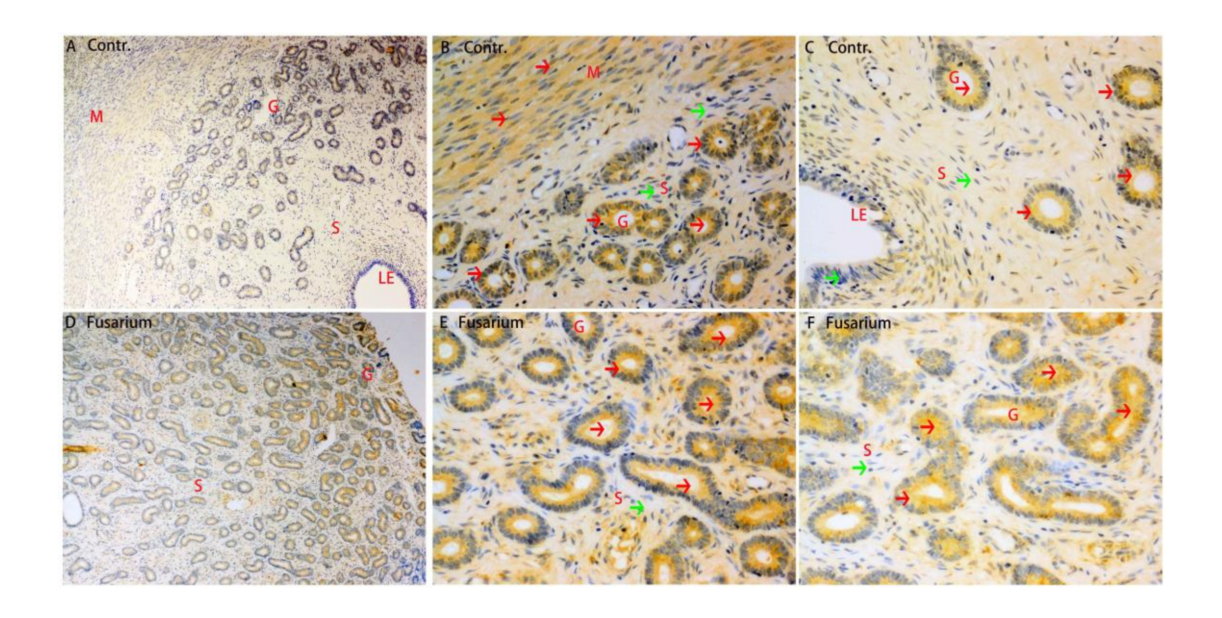
2.2 镰刀菌毒素对断奶母猪子宫中 ERα、ERβ 分布的影响

免疫组化结果显示仔猪子宫中 ERα、ERβ 免疫阳性反应为黄色、棕黄色或棕色，阴性对照组织不着色。说明本试验采用的免疫组化 SABC 法具有免疫反应的特异性。

2.2.1 镰刀菌毒素对断奶母猪子宫中 ERα 分布的影响

本试验观察结果显示，ERα 主要见于子宫内膜的腺上皮细胞和子宫肌层细胞，且为细胞质着色，而在子宫腔上皮及血管内皮细胞均未发现 ERα 分布（图 2-A,图 2-D）。与对照组（图 2-B,图 2-C）相比，试验组仔猪子宫腺 ERα 免疫阳性反应明显增强，且腺泡数量也明显增多（图 2-E,图 2-F）。试验组的腺上皮细胞大部分呈强阳性反应（图 2-E,图 2-F），而对照组的腺上皮细胞 ERα 免疫反应弱，且有不着色的上皮细胞存在，但 2 组子宫内膜基质呈 ERα 免疫阳性的细胞数量无明显差别。

.



A、D 为低倍图，B、C、E、F 为高倍图；LE 为子宫腔上皮，G 为子宫腺，S 为固有层基质，M 为子宫肌层，V 为血管；红色箭头示 ERα 免疫阳性细胞，绿色箭头为阴性。

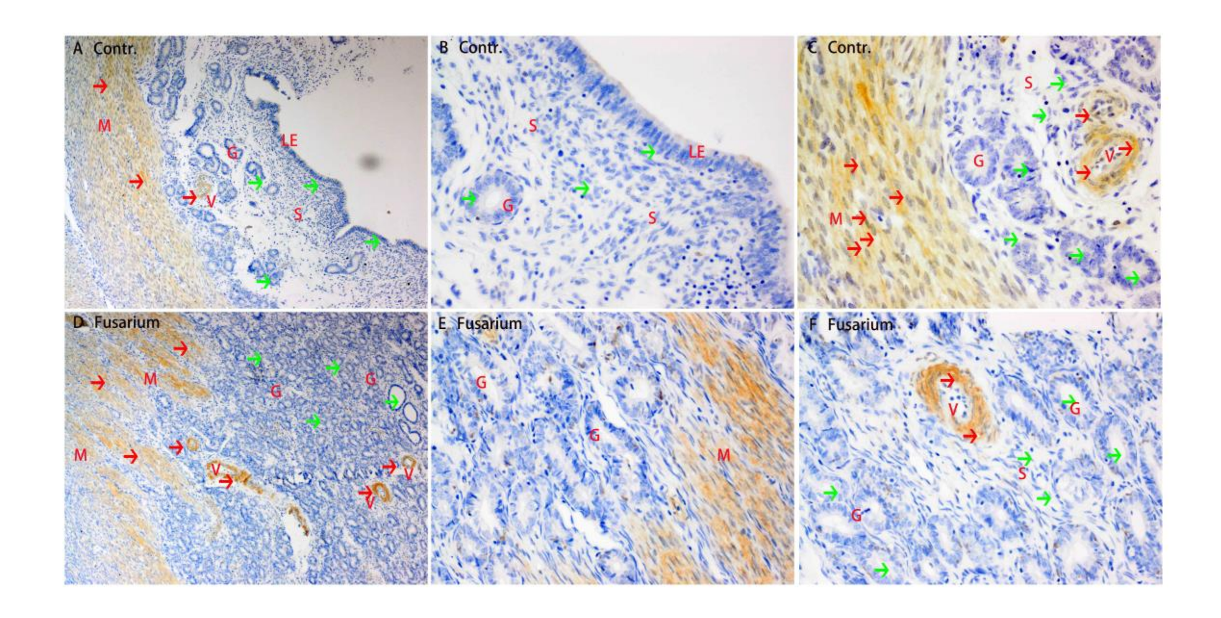
A and D were macroscopical pictures. B, C, E and F were microscopic pictures. LE was epithelium of uterine. G was uterine gland. S was stroma of lamina propria. M was myometrium. V was blood vessel. Red arrows showed immunoreactive cells of ERα, and green arrows showed immune-negative cells of ERα.

图 2　镰刀菌毒素对断奶母猪子宫中 ERα 分布的影响

Fig.2　Effects of *Fusarium* toxins on the ERα distribution in uterus of weaning gilts

2.2.2　镰刀菌毒素对断奶母猪子宫中 ERβ 分布的影响

ERβ 免疫阳性反应物质主要见于内膜的动脉管壁平滑肌和子宫肌层平滑肌细胞的胞质内（图 3-A,图 3-D），呈强阳性反应，而在子宫腺上皮细胞及基质细胞大多呈阴性（图 3-B,图 3-C，图 3-E，图 3-F），偶见有 ERβ 免疫阳性物质分布在腺上皮细胞及基质细胞的细胞核内，着色较弱。与对照组相比，试验组 ERβ 着色更强，阳性细胞数量更多，多分布在肌层平滑肌和动脉管壁平滑肌细胞（图 3-E,图 3-F）。对照组中发现少量基质细胞中存在 ERβ（图 3-C）。2 组对比 ERβ 在动脉管壁平滑肌分布无明显区别。



A、B、D 为肌层和动脉管壁平滑肌，C 为基质细胞，E 为肌层和腺上皮细胞，F 为动脉管壁平滑肌细胞和腺上皮细胞；LE 为子宫腔上皮，G 为子宫腺，S 为固有层基质，M 为子宫肌层，V 为血管；红色箭头示 ERβ 免疫阳性细胞，绿色箭头为阴性。

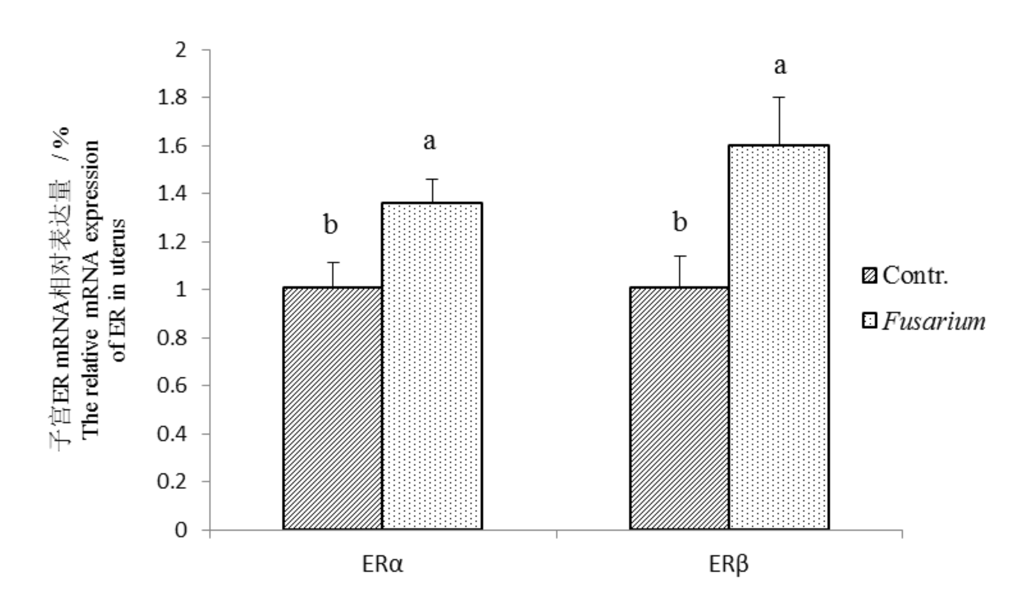
A, B and D were smooth muscle of muscular layer and arterial wall. C was stromal cell. E was cell of muscle layer and glandular epithelium. F was arterial smooth muscle and gland epithelial cell. LE was epithelium of uterine. G was uterine gland. S was stroma of lamina propria. M was myometrium. V was blood vessel. Red arrows showed immunoreactive cells of ERβ, and green arrows showed immune-negative cells of ERβ.

图 3　镰刀菌毒素对断奶母猪子宫中 ERβ 分布的影响

Fig.3　Effects of *Fusarium* toxins on the ERβ distribution in uterus of weaning gilts

2.3　镰刀菌毒素对断奶母猪子宫 *ERs* 的 mRNA 相对表达量的影响

镰刀菌毒素对断奶母猪子宫 *ERs* 的 mRNA 相对表达量的影响见图 4，与对照组相比，试验组子宫中 *ERα* 和 *ERβ* 的 mRNA 相对表达量均显著升高（P<0.05）。



数据柱标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Value columns with difference small mean significant difference (P<0.05).

图 4　镰刀菌毒素对断奶母猪子宫中 *ERα* 和 *ERβ* 的 mRNA 相对表达量的影响

Fig.4　Effects of *Fusarium* toxins on the relative mRNA expression of *Erα* and *ERβ* in uterus of weaning gilts （n=10）

3　讨　论

试验中尽管我们选择优质原料配制对照饲粮，但是遗憾的是对照饲粮中也检测到不同程度的毒素含量，这进一步说明我国镰刀菌毒素污染的普遍性及本研究的迫切性。本试验对照饲粮中 ZEN、DON 和 FUM 的含量低于我国饲料卫生标准（ZEN 含量<0.5 mg/kg，GB13078.2-2006；DON 含量<1 mg/kg，GB13078.3-2007；我国对于饲料中 FUM 含量还没有制定相应的限量标准）以及欧盟关于仔猪饲粮中 ZEN、DON 和 FUM 含量分别<0.1、0.9 和 5 mg/kg[8]的最高限量规定。而试验饲粮中 ZEN、DON 和 FUM 含量均超过我国饲料卫生标准和欧盟仔猪饲粮中的最高限量，因此对照组镰刀菌毒素的含量不影响试验组结果的判断。本试验条件下，镰刀菌毒素显著降低了断奶母猪平均日采食量和平均日增重，料重比则显著升高[9]。

3.1 镰刀菌毒素对断奶母猪生殖器官的影响

镰刀菌毒素中对生殖系统危害最大的是 ZEN。ZEN 具有雌激素效应，能与动物体内的 ERs 结合[10]，诱发母猪雌激素过多症，典型症状如阴户红肿潮湿、阴道直肠脱落、子宫增生以及乳腺增大等[3]。Rainey 等[11]发现母猪采食 1.5 mg/kg ZEN 的饲粮后，7 d 便出现阴户红肿现象。James 等[10]报道仔猪摄入 ZEN（3.61 和 4.33 mg/kg）污染饲粮，子宫重量几乎增加 1 倍。Chen 等[12]研究发现，低剂量 ZEN（1.1～3.2 mg/kg）能够显著增加断奶母猪生殖器官指数和阴户面积，且随 ZEN 增加呈剂量依赖特性。本试验条件下，试验组仔猪阴户明显红肿，阴户长、宽和面积均显著大于对照组仔猪，说明自然霉变饲粮中的镰刀菌毒素（0.90 mg/kg ZEN）对试验仔猪生殖器官产生毒害作用，这与前人研究结果一致。但本试验饲粮中除了 ZEN 外，还有一定剂量的 DON（1.43 mg/kg）和 FUM（5.85 mg/kg）。体外试验证实，ZEN 的代谢产物 α-玉米赤霉烯醇（7.5 μmoL/L）、β-玉米赤霉烯醇（30.0 μmoL/L）和 DON（1.88 μmoL/L）都能够显著抑制卵母细胞核成熟，然而 2 种毒素的作用机制尚不明确[13]。ZEN 和 DON（剂量均为 3.12 μmoL/L）都能够诱导纺锤体结构畸形，进而导致卵母细胞数量减少和胚胎异常，但是并没有发现 ZEN 和 DON 之间有协同作用[14]，更未见 DON 影响外阴和生殖器官指数的报道，也未见 FUM 对动物生殖系统的危害报道。而且镰刀菌毒素在动物体内的代谢过程复杂，体外试验不足以定论。本试验条件下的镰刀菌毒素对仔猪生殖器官的毒性影响是毋庸置疑的。有关 ZEN、DON 和 FUM 对断奶母猪生殖器官影响的相互关系，本课题组动物试验正在进行中。

3.2 镰刀菌毒素对断奶母猪 ERα、ERβ 在子宫中分布的影响

在哺乳动物中，ERs 主要有 ERα 及 ERβ 2 种亚型，均属核受体，但近些年发现其在细胞膜、细胞质广泛分布[15]。ERα 及 ERβ 在不同组织中均有分布，但有所差别，如 ERβ 主要集中在生殖系统、心血管系统、中枢神经系统、大脑以及骨组织中，而 ERα 则主要分布在生殖系统和乳腺组织中[16]。ERα 及 ERβ 与雌激素具有相似的结合能力，但是在雌激素作用

下，ERα 转录活性大于 ERβ，表明雌激素作用主要通过 ERα 调控[17]。

许琴[18]报道显示，ERα 主要表达于比格犬子宫内膜腺体细胞中，而 ERβ 主要表达于子宫内膜腺体细胞核及胞质，同时血管内皮细胞及平滑肌细胞胞质内也有表达。ZEN 能与动物体内的 ERs 结合，从而刺激 ERs 介导的信号转导过程。不同亚型 ERs 与 ZEN 的亲和力不同，Mueller 等[19]报道 ERα 比 ERβ 与 ZEN 更具亲和力。研究表明，ZEN 可能是通过影响雌二醇与 ERs 结合，提高去卵巢大鼠子宫 ERs 数量[20]。DON 和 FUM 对断奶母猪 ERs 在子宫中的表达分布尚未见报道。本试验免疫组化结果表明，断奶母猪子宫中各细胞成分均有 ERα、ERβ 分布。子宫中 ERα 主要分布在子宫腺上皮细胞，而 ERβ 则主要分布于动脉管壁平滑肌细胞、肌层平滑肌细胞、腺上皮细胞以及基质细胞。与对照组相比，试验组仔猪子宫腺中 ERα 分布广泛且子宫腺增生，促进了子宫腺发育，与 ERα 在子宫中的相对表达量显著增加的结果一致。试验组仔猪子宫中 ERβ 不仅广泛分布在动脉管壁平滑肌细胞和肌层平滑肌细胞，而且腺上皮细胞也有大量分布。本研究发现 ERβ 在血管内皮、肌层平滑肌细胞和基质细胞均有广泛分布，从而引起子宫平滑肌细胞增生，使得子宫壁增厚，这与生殖器官指数增大结果一致，但 ERβ 能否通过血管内皮进入血液以及 DON 和 FUM 是否影响母猪 ERs 在子宫中的分布和表达尚需进一步试验证实。

3.3 镰刀菌毒素对断奶母猪子宫 *ERα*、*ERβ* 的 mRNA 相对表达量的影响

在正常大鼠子宫中，*ERα* 与 *ERβ* 的 mRNA 均有表达，但 *ERα* 的表达占优势[21]。研究显示 *ERα* 的 mRNA 主要分布在子宫中，而 *ERβ* 的 mRNA 则主要分布在卵巢中[22-23]。Kuiper 等[24]研究表明，子宫中 ZEN 及其衍生物与 ERs 结合后从胞汁进入胞核的时间比雌激素进入胞核的时间长，从而引起 RNA 和 RNA 聚合酶活性增加。Zhang 等[4]用含有不同剂量 ZEN 饲粮饲喂妊娠小鼠时发现，小鼠子宫和卵巢中 *ERs* 表达量与 ZEN 含量之间存在剂量关系，均随 ZEN 剂量的增加而增加。王定发等[5]在饲粮中分别添加 0.5 和 2.0 mg/kg ZEN，均显著增加了青年母猪子宫中 *ERα* 的 mRNA 表达量，分别比对照组提高了 15%和 38%；而 *ERβ*

的 mRNA 的表达量则显著降低。仔猪采食 1.5 mg/kg ZEN 污染饲粮 28 d，子宫 *ERα* 的 mRNA 表达量变化不显著，而 *ERβ* 的 mRNA 表达量却是对照组的 2 倍[25]。DON 和 FUM 是否会影响断奶母猪子宫 *ERα*、*ERβ* 的 mRNA 表达量尚未见报道。本研究表明，断奶母猪饲喂自然霉变饲粮 35 d，显著上调断奶母猪子宫中 *ERα* 和 *ERβ* 的 mRNA 相对表达量，该结果与 ERs 在子宫中的分布一致。但多种毒素（ZEN、DON 和 FUM）之间的相互作用尚需进一步证实。本研究表明，镰刀菌毒素（尤其 ZEN）对断奶母猪阴户（红肿）和生殖器官（指数增大）的影响是通过改变子宫中 ERs 的分布和表达水平来调控的。

4　结　论

本研究条件下，镰刀菌毒素（ZEN 0.90 mg/kg，DON 1.43 mg/kg，FUM 5.85 mg/kg）显著增加断奶母猪阴户和生殖器官指数，显著增强 ERα 和 ERβ 在子宫中的分布和表达量。因此，镰刀菌毒素（尤其 ZEN）是通过增强 ERα 和 ERβ 在子宫中的分布和表达量来调控断奶母猪生殖器官发育的。但是 ZEN、DON 和 FUM 对断奶母猪生殖器官影响的相互关系尚需进一步试验证实。

参考文献：

[1] 陈心仪.亚洲地区饲料和畜禽养殖业霉菌毒素危害实况[J].饲料广角,2008(10):39–42.

[2] 敖志刚,陈代文.2006~2007 年中国饲料及饲料原料霉菌毒素污染调查报告[J].中国畜牧兽医,2008,35(1):152–156.

[3] STOB M,BALDWIN R S,TUITE J,et al.Isolation of an anabolic,uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*[J].Nature,1962,196(4861):1318.

[4] ZHANG Y Y,JIA Z Q,YIN S T,et al.Toxic effects of maternal zearalenone exposure on uterine capacity and fetal development in gestation rats[J].Reproductive Sciences,2014,21(6):743–7533.

[5] 王定发,彭运智,张妮娅,等.日粮中玉米赤霉烯酮和大豆异黄酮联合作用对后备母猪生殖器官发育和雌激素受体基因转录的影响[J].畜牧兽医学报,2011,42(2):243–250.

[6] 杨晓飞.四川地区主要饲料霉菌毒素分布规律的研究[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2007.

[7] NRC.Nutrient requirements of swine[M].11th ed.Washington D.C.:National Academy Press,2012.

[8] European Commission.Commission recommendation (2006/576/EC) of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol,zearalenone,ochratoxin A,T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding[S].Official Journal of the European Union L 229,2006.

[9] 陈祥兴,杨维仁,张崇玉,等.镰刀菌毒素对断奶仔猪生长性能、小肠二糖酶活性和抗氧化能力的影响[J].动物营养学报,2015,27(6):1875–1882.

[10] JAMES L J,SMITH T K.Effect of dietary alfalfa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine[J].Journal of Animal Science,1982,55(1):110–118.

[11] RAINEY M R,TUBBS R C,BENNETT L W,et al.Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts[J].Journal of Animal Science,1990,68(7):2015–2022.

[12] CHEN X X, YANG C W,HUANG L B,et al.Zearalenone altered the serum hormones,morphologic and apoptotic measurements of genital organs in post-weaning gilts[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2015,28(2):171–179.

[13] ALM H,GREISING T,BRÜSSOW K P,et al.The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on *in vitro* maturation of pig oocytes and *in vitro* culture of pig zygotes[J].Toxicology in Vitro,2002,16(6):643–648.

[14] MALEKINEJAD H,SCHOEVERS E J,DAEMEN I J J M,et al.Exposure of oocytes to the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs[J].Biology of Reproduction,2007,77(5):840–847.

[15] LEVIN E R.Invited review:cell localization,physiology,and nongenomic actions of estrogen receptors[J].Journal of Applied Physiology,2001,91(4):1860–1867.

[16] WANG L,ANDERSSON S,WARNER M,et al.Estrogen receptor (ER)β knockout mice reveal a role for ERβ in migration of cortical neurons in the developing brain[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2003,100(2):703–708.

[17] COUSE J F,KORACH K S.Estrogen receptor null mice:what have we learned and where will they lead us?[J].Endocrine Reviews,1999,20(3):358–417.

[18] 许琴.比格犬子宫与卵巢 Erα、ERβ 的表达及 ERβ 新剪接异构体的研究[D].博士学位论文.长春:中国人民解放军军事医学科学院,2013.

[19] MUELLER S O,SIMON S,CHAE K,et al.Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ERα) and ERβ in human cells[J].Toxicological Sciences,2004,80(1):14–25.

[20] 吕斌,闻京伟,李振国,等.玉米赤霉烯酮对大鼠子宫雌激素受体影响的探讨[J].医药论坛杂志,2010,31(18):37–38.

[21] HIROI H,INOUE S,WATANABE T,et al.Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus[J].Journal of Molecular Endocrinology,1999,22(1):37–44.

[22] COUSE J F,LINDZEY J,GRANDIEN K,et al.Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor-β (ERβ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-knockout mouse[J].Endocrinology,1997,138(11):4613–4621.

[23] KUIPER G G,ENMARK E,PELTO-HUIKKO M,et al.Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1996,93(12):5925–5930.

[24] KUIPER-GOODMAN T,SCOTT P M,WATANABE H.Risk assessment of the mycotoxin

zearalenone[J].Regulatory Toxicology and Pharmacology,1987,7(3):253–306.

[25] OLIVER W T,MILES J R,DIAZ D E,et al.Zearalenone enhances reproductive tract development,but does not alter skeletal muscle signaling in prepubertal gilts[J].Animal Feed Science and Technology,2012,174(1/2):79–85.

Effects of *Fusarium* Toxins on Vulva Size, Reproductive Organ Index, Distribution and Expression of Estrogen Receptors in Uterus of Weaning Gilts

NIU Qunsheng YANG Weiren* HUANG Libo ZHANG Chongyu ZHANG Guiguo LIANG Caizhi JIANG Shuzhen*

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, *China*)

Abstract: The aims of the study were to investigate the effect of *Fusarium* toxins on vulva size, reproductive organ index, distribution and expression of estrogen receptors of uterus in weaning gilts. A total of 40 healthy weaning gilts (Duroc **错误!未找到引用源。**Large White **错误!未找到引用源。**Landrace) aged at 35 d with an average body weight of（8.45±0.94）kg were used in the study. Gilts were randomly allocated into 2 treatments with 20 in each group. Control group fed a basal diet, and experimental group were exposed to feed naturally contaminated with *Fusarium* toxins [zearalenone (ZEN) 0.90 mg/kg; deoxynivalenol (DON) 1.43 mg/kg; fumonisin (FUM) 5.85 mg/kg] for 35 days after 7 days adaptation. The results showed that the the length, width and area of vulva and reproductive organ index of weaning gilts at 35 days in experimental group were significantly higher than that in control group （P<0.05）. There was a higher intensity of immunopositive staining for estrogen receptors α （ERα） in cytoplasm of endometrial glandular

epithelial cells and uterine muscle cells. Whereas immunopositive staining for estrogen receptors β （ERβ） was most expressed in cytoplasm of smooth muscle cells in the intima of arteries and muscle layer smooth muscle cells. The ERα positive reaction and acinus number of the endometrial glandular epithelial cells in experimental groups were higher than that in control group. However, the ERβ positive reaction of the toxins-treated gilts was found in the smooth muscle cells of the uterine muscle and the arterial wall smooth muscle cells. The the relative mRNA expression of *Erα* and *ERβ* in uterus of weaning gilts in experimental group were significantly higher than that in control group （P<0.05）. The results suggested *Fusarium* toxins have deleterious effect on reproductive system. This effect was mediated through changing the expression of *ERs* regulated by the transcription of *ERs* gene in uterus, and then changed the development of the reproductive organs.

Key words: *Fusarium* toxins; weaning gilts; vulva; uterus; estrogen receptors

---

*Corresponding authors, YANG Weiren, professor, E-mail: wryang@sdau.edu.cn; JIANG Shuzhen, associate professor, E-mail: shuzhen305@163.com (责任编辑　武海龙)